

## 2 种神经肽在奶山羊下丘脑中的共存

林磊, 蒋田园, 陈树林\*, 李文献, 郑毛亮, 赵慧英, 范光丽, 李颖

(1. 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西杨凌 712100; 2. 河南省乳品工程技术研究中心, 河南郑州 450008)

**摘要** 为了探讨下丘脑中促性腺激素释放激素(GnRH)和催产素(OT)在同一细胞有无共存的现象, 实验采用免疫组化链霉素抗生物素-过氧化物酶法对GnRH与OT免疫反应物在妊娠周期奶山羊下丘脑的分布进行双重酶标记研究。结果显示, 在室旁核、视上核、视前交叉上核、弓状核、下丘脑外侧区、乳头体内侧核、乳头体后核等18个核团(区)有GnRH/OT双标记免疫反应阳性细胞。阳性细胞的形状有圆形、卵圆形、多角形; 有的阳性细胞突起明显。根据细胞中阳性物质的多少和核团中阳性细胞数量, 可分为强阳性、中等阳性、弱阳性核团。GnRH与OT在上述核团的某些细胞的共存现象为GnRH与OT在功能上的相互调节提供了形态学依据。

**关键词** 促性腺激素释放激素; 催产素; 下丘脑; 妊娠奶山羊; 免疫组化SP法

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)18-05452-02

促性腺激素释放激素(Gonadotropin releasing hormone, GnRH)是动物生殖过程中最重要的激素之一, 是由9种不同的氨基酸残基组成的十肽。1971年, Shally等<sup>[1]</sup>首先从猪的下丘脑分离并提纯得到GnRH。GnRH除对垂体内卵泡刺激素和黄体生成素的分泌有强大调节作用外, 还对多种组织和器官的正常功能具有调节作用, 如性腺、肾上腺皮质和大脑组织等。催产素(Oxytocin, OT)是下丘脑中最早被发现并阐明结构的神经肽, 由9个氨基酸组成。OT除对生殖活动的调节发挥重要作用外, 对心血管功能、消化功能、体液渗透压、神经免疫和体温等也有调节作用, 并与应激反应、学习记忆、睡眠与觉醒、痛觉调制、动物的行为活动等密切相关。在生殖功能上GnRH和OT密切相关, 二者共同作用于下丘脑-垂体-性腺轴。在功能上, GnRH和OT还可调节与性腺活力长期相关的过程, 包括有丝分裂、蛋白合成释放和细胞分化<sup>[2]</sup>。OT可通过刺激NO释放而促进下丘脑内侧的GnRH释放<sup>[3]</sup>。诸多的生理功能的研究表明, GnRH和OT在一定程度上可相互调节。而生理功能的产生必定有其形态学基础, 近年来的形态学研究表明, 下丘脑中GnRH和OT免疫反应阳性神经元分布范围广泛, 涉及多个核区, 二者所分布的核区基本相似<sup>[4-8]</sup>。但GnRH和OT是否在下丘脑同一细胞中共存, 尚未见文献报道。因此, 该实验拟采用超敏的双标记免疫组化链霉素抗生物素-过氧化物酶法对GnRH和OT共存关系进行研究, 为进一步研究2种激素在下丘脑中的相互作用提供理论依据。

### 1 材料与方 法

**1.1 材料** 妊娠早期、中期和晚期奶山羊各10只, 临床健康。颈动脉放血致死, 迅速取下头部, 通过颈动脉灌注生理盐水清洗血液, 后灌注4%多聚甲醛磷酸缓冲液, 开颅取脑, 切取下丘脑, 放入固定液中固定12h。之后放入20%蔗糖PB液, 组织块沉底后即可进行切片。用冰冻切片机对下丘脑作连续切片, 厚度为35 μm。然后进行HE染色和免疫组化SP法染色, 并设立阴性对照。

**1.2 双重酶标记免疫组化SP法操作程序** 切片经0.01 mol/L PBS液(pH值7.4)漂洗3次, 每次10 min; 切片在室温

下用过氧化物酶阻断液(试剂A)孵育40 min; 用0.01 mol/L PBS液(pH值7.4)漂洗3次, 每次10 min, 切片入非免疫动物血清(试剂B), 室温下孵育40 min; 入第一抗体(鼠源性OT单克隆抗体、兔源性GnRH多克隆抗体, 工作浓度分别为1 500, 1 500, 武汉博士德公司产品), 室温孵育24~48 h。0.01 mol/L PBS液(pH值7.4)漂洗3次, 每次10 min; OT染色程序: 加生物素标记的第二抗体(试剂C<sub>OT</sub>), 室温下孵育1.5 h; 用0.01 mol/L PBS液(pH值7.4)漂洗3次, 每次10 min; 加链亲合素-过氧化物酶溶液(试剂D<sub>OT</sub>), 室温下孵育1.5 h(所用A、B、C、D液为福州迈新公司生产SP试剂盒); 0.01 mol/L PBS液(pH值7.4)漂洗3次, 每次10 min, 入DAB显色液呈色, 显色时间为40 min左右, 蒸馏水洗2遍终止反应后, PBS液洗2遍。接着进行GnRH染色程序: 加生物素标记的第二抗体(试剂C<sub>GnRH</sub>), 室温下孵育1.5 h; 用0.01 mol/L PBS液(pH值7.4)漂洗3次, 每次10 min; 加链亲合素-过氧化物酶溶液(试剂D<sub>GnRH</sub>), 室温下孵育1.5 h; 0.01 mol/L PBS液(pH值7.4)漂洗3次, 每次10 min, 入AEC显色液呈色, 切片显色时间为5~20 min。蒸馏水洗2遍终止反应后, PBS液洗2遍, 每次15 min, 进行贴片, 晾干, 甘油封固, 镜检。

阴性对照实验: 用0.01 mol/L的PBS代替一抗孵育切片, 其余同前所述。

**1.3 图像分析及统计学处理** 用江苏捷达软件对图像进行分析, 结果以( $\bar{x} \pm s$ )表示, 用SPSS13.0数据统计分析软件对侧面面积中的阳性细胞进行分析, 单因素方差分析法(ANOVA)测试妊娠早、中和晚期对GnRH/OT双标细胞数目的差异性的影响(当P < 0.05时, 表示差异显著)。然后用单因素方差分析法(ANOVA)中的LSD检验妊娠早、中和晚期GnRH/OT双标记细胞在下丘脑各核团分布的差异性。

### 2 结果与分析

应用双重酶标记免疫组化SP法染色神经元, 发现GnRH/OT阳性细胞多呈棕黑色。代表OT的蓝色颗粒多分布于阳性细胞内靠近细胞中心处, 而代表GnRH的红色颗粒在整个阳性细胞中均有分布, 包括在细胞突起中也有分布。按照细胞内着色颗粒的多少和着色的深浅可将细胞分为强阳性、中等阳性、弱阳性细胞3种。其中, 强阳性细胞呈深紫色, 细胞轮廓清晰, 细胞中心着色较浅; 中等阳性细胞呈棕黑色, 细胞边缘较清晰; 弱阳性细胞呈浅棕色, 细胞中央不着色, 或着色很浅, 细胞轮廓模糊。阳性细胞呈三角形、多边

基金项目 国家自然科学基金(30170683); 陕西省自然科学基金; 河南省乳品工程技术研究中心科研基金。

作者简介 林磊(1979-), 男, 广西柳州人, 硕士研究生, 研究方向: 神经生物学和细胞生物学。\* 通讯作者。

收稿日期 2007-03-24

形、椭圆形、梭形、菱形或不规则形,有的可见到明显的突起。细胞大小各异(图1、2、3)。从图3可见,在妊娠后期室旁核(PVN)中 OT-GnRH 的数目比妊娠早期的有增加(ANOVA:  $P = 0.026$ ;LSD:  $P = 0.001$ ),妊娠中期室旁核 OT-GnRH 数目与妊娠早期相比没有明显变化(LSD:  $P = 0.067$ );在视上核(SON)中,妊娠后期 OT-GnRH 数目比妊娠早期有明显增加(ANOVA:  $P = 0.020$ ;LSD:  $P = 0.022$ ),妊娠中期 OT-GnRH 数目较妊娠早期没有变化(LSD:  $P = 0.081$ );在弓状核中,妊娠后期 OT-GnRH 数目比妊娠早期有明显增加(ANOVA:  $P = 0.016$ ;LSD:  $P = 0$ ),妊娠中期 OT-GnRH 数目较妊娠早期也有增加(LSD:  $P = 0.042$ );在视前交叉上核、下丘脑外侧区、视前外侧区、下丘脑前区、腹内侧核、穹隆周核、下丘脑后核、结节乳头体核、乳头体内外侧区、乳头体后核,妊娠中后期较妊娠早期 OT-GnRH 双标细胞数目减少明显;在背内侧核妊娠中期 OT-GnRH 细胞数目比妊娠早期的有明显增加(ANOVA:  $P = 0.031$ ;LSD:  $P = 0.005$ ),妊娠后期较早期变化不明显。

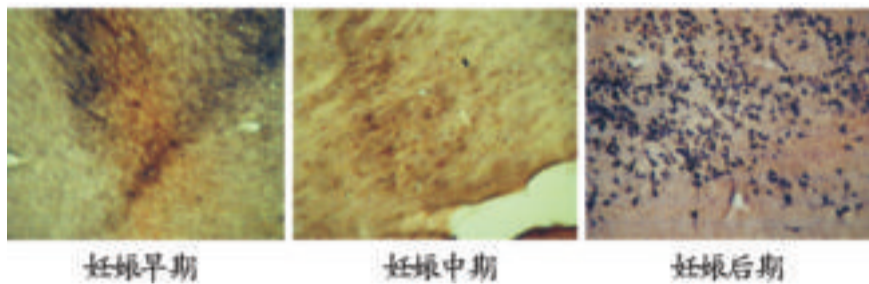


图1 PVN 含有 OT-GnRH 的数目

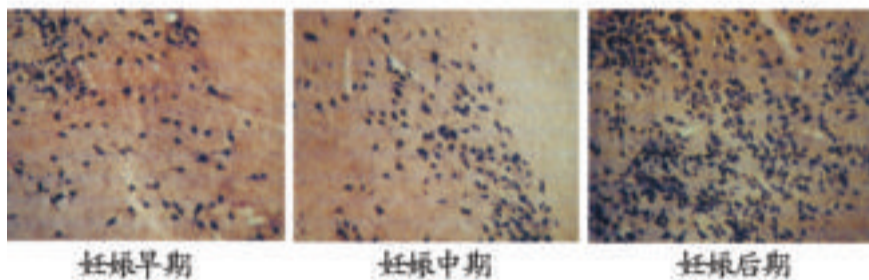


图2 SON 含有 OT-GnRH 的数目

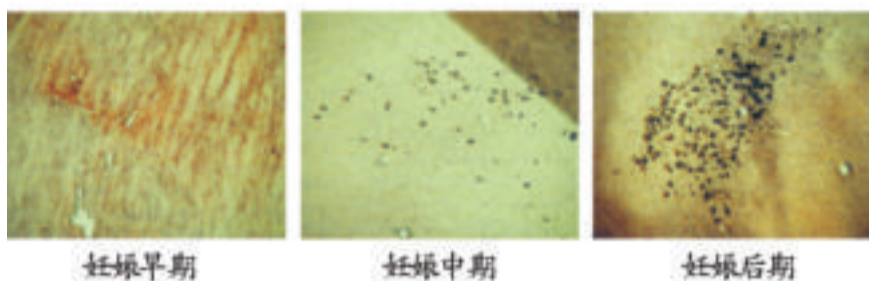
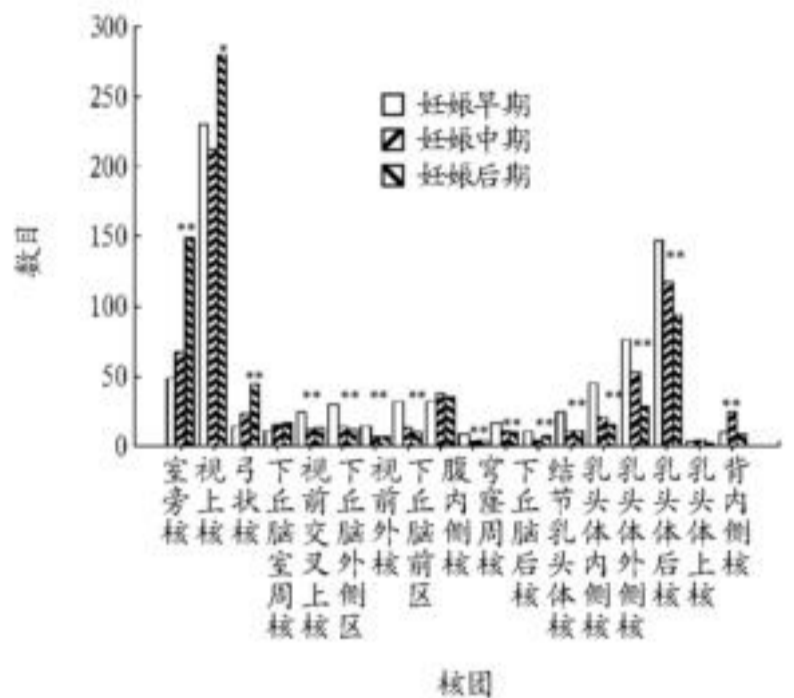


图3 AUN 含有 OT-GnRH 的数目

### 3 讨论

从已有的研究来看,OT 和 GnRH 在生理功能上的相互联系主要表现在对生殖的调控上。下丘脑弓状核和下丘脑中缝基底部的神经元脉冲式释放的 GnRH 在妊娠早期对调节胎盘激素产生一定的生理作用,下丘脑 GnRH 脉冲式的启动并不具有固定的、有规律的周期性调节,而主要是依据在妊娠周期各阶段 OT 各个峰值之间以及其他生理情况而随机产生信号<sup>[8]</sup>。该实验也证明了这一点。性激素可以通过影响弓状核神经元的功能来反馈调节 GnRH 的释放,这些神经元是性激素反馈调节 GnRH 的靶细胞,对生殖与性行为的调节有重要作用<sup>[9]</sup>。从图4可见,在妊娠后期,GnRH 脉冲式释放的频率较妊娠前期有所增加,GnRH 这种脉冲式分泌对维持垂体性腺功能和正常分娩至关重要。与此同时,OT 系统也会发生一系列的变化,如下丘脑中 OTmRNA 增加,分泌 OT 的大细胞神经元在形态、电生理方面发生改变。笔者认为,

这种变化对启动产后泌乳系统有着重要意义,泌乳系统的启动以血液中 OT-GnRH 含量的明显增加为标志,产后的母性行为(如护崽)也与 OT-GnRH 血液中的含量有关。鉴于 OT 和 GnRH 在对生殖调控方面有一定协同性,人们一直在探索 OT 和 GnRH 相互作用的形态学基础,Gambacciani 等<sup>[10]</sup>认为,在正中隆起的神经末梢水平,OT 可通过 OT 受体介导机制来抑制 GnRH 的释放,推测 OT 神经系统可能参与 GnRH 生理性分泌的调制。



注:\* 表示  $P < 0.05$  差异显著,\* \* 表示  $P < 0.01$  差异极显著 (都与妊娠早期相比较)。

图4 OT-GnRH 免疫双标细胞在下丘脑某些核团的分布特点

实验表明在下丘脑某些核区如室旁核、视上核、穹隆周核、室周核、弓状核、结节乳头体核、交叉上核和乳头体等核团(☒)同时分布有 OT 和 GnRH 免疫反应阳性细胞,并在下丘脑 18 个核团(☒)出现 GnRH OT 免疫反应阳性双标记细胞,阳性反应由强到弱依次为:室旁核、视上核、视前交叉上核、结节乳头体核、弓状核、下丘脑室周核和穹隆周核等。这说明 OT 与 GnRH 在上述核团的某些细胞中共存,这就为 OT 与 GnRH 在功能上的相互调节提供了形态学基础。从图4可见,从妊娠早期到晚期,OT-GnRH 双标细胞的数目在 PVN、SON 和 AUN 中有明显增加;在视前交叉上核、下丘脑外侧区、视前外侧区、下丘脑前区、腹内侧核、穹隆周核、下丘脑后核、结节乳头体核、乳头体内外侧区、乳头体后核中,其有减少。因此,笔者认为 OT 与 GnRH 在妊娠周期中的相互调节作用受 2 个因素的制约:第一,OT 或 GnRH 在血液中的量来决定彼此是相互促进或抑制;第二,与所处的妊娠周期有关。

### 参考文献

- [1] SHALLY AV. Structure of the porcine LH and FSH releasing hormone confirmation of the proposed structure by conventional sequential analyses [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1971, 44(1): 459-463.
- [2] BRUCE SC, KARYNL, NANCY LC. Neonatal manipulation of oxytocin influences female reproductive behavior and success [J]. *Hormones and Behavior*, 2005, 47(1): 22-28.
- [3] HANSENNEI, RASIER G, PEQUEUX C, et al. Ontogenesis and functional aspects of oxytocin and vasopressin gene expression in the thymus network [J]. *Journal of Neuroimmunology*, 2005, 158(1): 67-75.
- [4] DUDAS B, MERCHENTHALER I. Topography and associations of leu-enkephalin and luteinizing hormone-releasing hormone neuronal systems in the human diencephalon [J]. *Journal Clin Endocrinology Metab*, 2003, 88(4): 1842-1848.

( 上接第5453 页)

- [5] 陈树林, 孙志宏, 卿素珠, 等. GnRH 神经元在发情期奶山羊下丘脑中的免疫组化定位[J]. 中国农学通报, 2005, 21(2) :1 - 3.
- [6] 沈霞芬, 贾维珍, 戚鹏先, 等. 奶山羊下丘脑中催产素神经元的分布——ABC 法研究[J]. 西北农业大学学报, 1993, 21(4) :65 - 69.
- [7] 陈树林, 赵慧英, 孙志宏, 等. 青年奶山羊下丘脑催产素神经元分布特点[J]. 中国农学通报, 2005, 21(1) :5 - 7.

- [8] 卿素珠, 陈树林, 沈霞芬. 发情周期中奶山羊下丘脑- 垂体- 卵巢轴催产素的免疫组化定位[J]. 中国兽医学报, 2003, 23(3) :300 - 302.
- [9] TARLAZISL B C, FAUSER B C, KOIBIANAKS E Met al . GnRH antagonists in ovarian stimulation for IVF[J]. Human Reproduction Update, 2006, 12(4) :333 - 340.
- [10] GAMBACCIANI M, YEN SS, RASMLSEN DD. GnRH release from the mediobasal hypothalamus. In vitro regulation by oxytocin[J]. Neuroendocrinology, 1986, 42(2) :181 - 183.